
(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020020005215 A
(43)Date of publication of application: 17.01.2002

(21)Application number: 1020000035920
(22)Date of filing: 28.06.2000

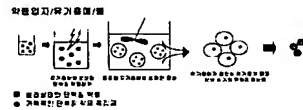
(71)Applicant: KOREA ADVANCED
INSTITUTE OF SCIENCE
AND TECHNOLOGY
(72)Inventor: KIM, HONG GI
PARK, TAE GWAN

(51)Int. Cl. A61K 9/52

(54) BIODEGRADABLE MICROPARTICLE CARRIER FOR CONTINUOUS CONTROLLED RELEASE OF DRUG AND PRODUCTION THEREOF

(57) Abstract:

PURPOSE: A process of preparing a biodegradable microparticle carrier containing a reversible protein aggregate with a polymer using reversible coagulation of protein is provided. Whereby, the carrier inhibits an initial burst effect of protein drugs and induces continuous release of drugs.



CONSTITUTION: The microparticle carrier is prepared by the following process of: (i) obtaining a reversible protein drug aggregate by dispersion of a protein drug aqueous solution in a first organic solvent containing a polyester-based polymer and a surfactant; (ii) obtaining an inclusion body by hardening the inclusion body by removal of the remaining organic solvent under ordinary temperature and pressure after the formation of the inclusion body containing protein drugs by dispersion of the reversible protein aggregate in the polymer solution by addition of an excess amount of a buffer solution containing a surfactant and saturated with a secondary organic solvent.

COPYRIGHT KIPO 2002

Legal Status

Date of final disposal of an application (20030404)
Patent registration number (1003813820000)
Date of registration (20030409)

ATTORNEY DOCKET NO.: 11617-003-999
SERIAL NO.: 10/534,991
REFERENCE: B02

(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. A61K 9/52	(11) 공개번호 (43) 공개일자	특2002-0005215 2002년01월17일
(21) 출원번호	10-2000-0035920	
(22) 출원일자	2000년06월28일	
(71) 출원인	한국과학기술원, 윤덕용 대한민국 305-338 대전 유성구 구성동 373-1	
(72) 발명자	김홍기 대한민국 435-040 경기도군포시산본동삼성장미아파트1140동704호 박태관 대한민국 305-390 대전광역시유성구전민동엑스포아파트211동1501호	
(74) 대리인	이한영	
(77) 심사청구	있음	
(54) 출원명	지속적 약물조절방출이 가능한 생분해성 미립담체 및 그의제조방법	

요약

본 발명은 단백질의 가역적 응집현상을 이용하여, 고분자로 봉입된 가역적인 단백질 응집체를 포함하는 생분해성 고분자 미립담체 및 그의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명의 약물 조절방출이 가능한 생분해성 고분자 미립담체는 (1) 폴리에스테르계 고분자 및 계면활성제를 포함하는 1차 유기용매내에 단백질 약물 수용액을 분산시킴으로써 가역적 단백질 약물 응집체를 수득하는 단계; 및, (2) 계면활성제를 포함하여 1차 유기용매와 동종인 2차 유기용매로 포화된 과량의 완충액을 첨가하여 전기 가역적 단백질 약물 응집체를 고분자 용액내에 분산시켜 유화시켜 단백질 약물 함유한 봉입체를 형성시키고, 상온 상압하에서 잔여 유기용매를 제거함에 따라 봉입체를 경화시켜 미립담체를 수득하는 단계를 포함하는 제조방법에 의하여 제조된다. 본 발명에 의하면, 단백질약물의 가역적인 응집체가 수용액에 다시 용해됨에 따라, 약물이 가역적 용해속도에 따라 미립담체내에서 지속적으로 방출되는 특징을 가진다.

대표도

도1

색인어

가역적 단백질 약물 응집체, 미립담체

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 미립 담체의 제조방법을 간략하게 나타낸 모식도이다.

도 2는 단백질 약물 응집체의 가역적인 성질을 나타낸 그래프이다.

도 3a는 종래기술의 제조방법에 따른 인간성장호르몬을 함유한 미립 담체의 주사현미경 사진이다.

도 3b는 본 발명의 실시예 2-1에 따른 인간성장호르몬을 함유한 미립 담체의 주사현미경 사진이다.

도 3c는 본 발명의 실시예 2-2에 따른 인간성장호르몬을 함유한 미립 담체의 주사현미경 사진이다.

도 4는 시간의 변화에 따른 인간성장호르몬을 함유한 미립 담체의 방출량을 나타낸 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 지속적 약물조절방출이 가능한 생분해성 미립담체 및 그의 제조방법에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 단백질의 가역적 응집현상을 이용하여, 고분자로 봉입된 가역적인 단백질 응집체를 포함하는 생분해성 고분자 미립담체 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

현재까지 사용되고 있는 주사용 또는 경구용 제제는 혈중의 약물농도를 일정하게 조절하기 어려운 단점이 있어서, 혈중 약물농도를 일정하게 유지하기 위하여 생분해성(biodegradable) 고분자 담체내에 약효를 가진 약물의 봉입함으로써, 고분자 담체가 서서히 분해되면서 약물이 천천히 방출될 수 있는 제제에 대한 연구가 진행되어 왔다(참조: Langer, R., Chem. Eng. Commun., 6, 1-48, 1980; Langer, R.S. and Peppas, N.A., Biomaterials, 2, 201-214, 1981; Heller, J., CRC Crit. Rev. Ther. Drug Cattrier Syst., 1(1), 39-90, 1984; Holland, S.J. Tighe, B.J. and Gould, P.L., J. Controlled Release, 155-180, 1986).

상술한 생분해성 고분자 담체 시스템을 도입하는 경우, 고분자 담체는 서서히 분해되어 독성이 없는 저분자 물질로 되는 바, 지속성 약물이 방출된 후 별도로 고분자 담체의 외과적 제거과정을 필요로 하지 않는다는 장점이 있어서, 이를 광범위한 의약품에 적용하기 위한 연구가 계속되어 왔으며, 현재까지 전기 생분해성 고분자 담체를 이용한 약물방출 조절기술이 작은 분자량을 가진 생리활성 화합물을 중심으로 연구되었다. 그러나, 최근 펩타이드나 단백질 등의 거대 분자가 새로운 치료약물로 개발됨에 따라, 이들 약물을 고분자 담체 내에 봉입시켜 지속적으로 방출시키는 방향으로 연구의 초점이 맞추어지고 있다.

그 결과, 다양한 고분자 담체가 개발되었으며, 예를 들어 지방족 폴리에스테르는 이미 그 생체적합성이 증명되어 미국식품의약국(FDA)에 의해 승인을 받았으며, 약물전달용 담체 또는 수술용 봉합사 등의 용도로 널리 사용되어 왔다. 전기 지방족 폴리에스테르의 구체적인 예로는, 폴리-L-락트산, 폴리글리콜산, 폴리-D-락트산-co-글리콜산, 폴리-L-락트산-co-글리콜산, 폴리-D,L-락트산-co-글리콜산 (poly(D,L-lactic-co-glycolic acid), 이하 'PLGA'라 함), 폴리-카프로락톤, 폴리-발레로락톤, 폴리-하이드록시 부티레이트 및 폴리-하이드록시 발러레이트 등이 포함된다(참조: Peppas, L. B., International Journal of Pharmaceutics, 116, 1-9, 1995).

한편, 전기 지방족 폴리에스테르로 이루어진 미립 담체에 단백질 약물을 봉입한 제형의 경우, 일정 기간동안 일정한 속도로 약물의 방출을 조절하는 데에 큰 어려움이 있는데, 이는 약물의 초기 과다 방출(initial burst effect)과 미립담체 내에서 약물이 밖으로 방출되지 못하기 때문이다. 이러한 약물의 초기 과다 방출은 미립구 표면 및 구멍에 응집 및 흡착되어 있던 단백질 약물들의 확산에 의해 일어나며, 불완전한 방출의 문제는 단백질 약물이 그 성질이 변성되어 비가역적으로 응집되어 발생하게 되며, 특히 단백질 같은 거대분자 약물의 경우 전기 비가역적 응집으로 인한 불완전한 방출이 약물전달에 있어서 큰 문제점으로 대두되었다. 예를 들면, 소의 혈청알부민, 라이소자임(lysozyme) 등의 단백질 약물의 경우 초기에다량의 약물이 방출된 후 최종방출량이 50% 전후이고(참조: Crofts, G. and Park, T.G., J. Control. Release, 44, 123-134, 1997; Leonard, N.B., Michael, L. H., Lee, M.M. J. Pharm. Sci., 84, 707-712), 재조합인간성장호르몬(recombinant human growth hormone)을 폴리에스테르를 담체로 이용하여 미립구에 도입하는 경우, 30 내지 50%의 단백질 약물이 초기에 과다 방출되며, 이후 40 내지 60% 정도의 양이 방출되지 못하고 미립담체내에 그대로 남아있었다는 것이 보고되었다(참조: Yan, C., et al., J. Control. Release, 32, 231-241, 1994; Kim, H.K. and Park, T.G., Biotechnol. Bioeng., 65, 659-667, 1999)

따라서, 단백질 약물전달의 문제점을 해결하고자 안정제를 첨가하거나 제제 공정을 개선하고자 하는 연구가 계속되어 왔다(참조: Lu, W. and Park, T.G., J. Pharm. Sci. Technol., 49, 13-19, 1995; Tracy, MA., Biotechnol. Prog., 14, 108-115, 1998; Maa Y, Nguyen P, Hsu, S., Biotechnol. Bioeng., 87, 152-159, 1998; Johnson, O.L., et al., Pharm. Res., 14, 730-735, 1997). 예를 들면, 계면활성제 계열의 트윈-20(Tween-20), 트윈-40(Tween-40), 트윈-80(Tween-80), 플루로닉 F-38(Pluronic F-38), 플루로닉 F-68(Pluronic F-68), 플루로닉 F-127(Pluronic F-127), 또는 당류인 글루코스(glucose), 프룩토스(fructose), 락토스(lactose), 수크로스(sucrose), 트레할로스(trehalose), 갈락토스(galactose), 덱스트란(dextran), 만노스(mannose), 솔비톨(sorbitol), 만니톨(mannitol), 카르복시메틸셀룰로오스(carboxymethylcellulose), 덱스트로스(dextrose), 이노시톨(inositol), 락티톨(lactitol), 말토스(maltose), 말토덱스트린(maltodextrin), 자일로스(xylose) 등이 단백질 약물전달에 사용될 수 있으며, PEG 6000, PEG 8000, 폴리비닐알콜(polyvinyl alcohol, PVA), 폴리비닐피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone, PVP), 프롤린(Prolin), Ficoll, Ficol 170, 황산암모늄(ammonium sulfate), 우레아(urea), 아르기닌(arginine) 등이 미립담체 제형의 단백질 안정성 개선에 사용될 수 있음이 보고되었다(참조: Cleland, J.L. and Jones, A.J.S., Pharm. Research, 13, 1464-1475; Costantino, H.R., Langer, R., Klibanov, A. M., Biotechnology, 13, 493-496; Frye, K.J., and Royer, C.A., Protein Sci., 6, 789-793, 1997; Putney, S.D. and Burke, P.A., Nature Biotech., 16, 153-157, 1998). 그러나, 전기 안정제를 또한 초기 과다방출을 억제하고 미립담체 내에서 완전히 약물을 일정한 속도로 방출하지 못하여, 단백질 약물의 안정성을 충분히 보장하지 못하는 단점을 내포하고 있었다.

그러나, 최근 인간성장호르몬을 아연 2가 이온(Zn^{2+})을 이용하여 안정화된 이량체로 만듦으로써, 미립담체에 봉입하는 과정에서, 그리고 봉입 이후의 상태에서 단백질의 안정성을 개선시킨 연구가 보고되었으나(참조: Cleland, J.L., et al., Pharm. Research, 14, 420-425, 1997; Cleland, J.L., et al., Adv. Drug Delivery, 28, 71-84, 1997), 이는 인간성장호르몬에 있어서의 특이적인 경우이며, 일반적인 단백질 약물에 적용하기 어렵고 안정제를 사용해야 하는 번거로움이 단점이 있는 바, 일반적인 단백질 약물에 적용하여 약물을 초기 과다방출 없이 완전히 미립담체내에서 방출하도록 하는 기술은 여전히 미해결책으로 남아 있었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 단백질 약물의 초기 과다 방출을 억제하고, 약물의 지속적인 방출을 유도하는 미립담체를 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 수용액과 잘 혼합되는 성질을 가진 유기용매를 사용하여 안정한 단백질 약물의 응집체를 형성하여, 이를 생분해성 폴리에스테르계 고분자 미립담체에 봉입함으로써, 단백질 약물의 비가역적인 변성된 응집체의 형성을 막음으로써, 단백질약물의 가역적인 응집체가 수용액에 다시 용해됨에 따라, 약물이 미립담체내에서 지속적으로 방출되어 분비될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

결국, 본 발명의 주된 목적은 생분해성 고분자 미립담체를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 전기 생분해성 고분자 미립담체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 약물조절방출이 가능한 생분해성 고분자 미립담체는 (1) 폴리에스테르계 고분자 및 계면활성제를 포함하는 1차 유기용매내에 단백질 약물 수용액을 분산시킴으로써 가역적 단백질 약물 응집체를 수득하는 단계; 및, (2) 계면활성제를 포함하며 1차 유기용매와 동종인 2차 유기용매로 포화된 과량의 완충액을 첨가하여 전기 가역적 단백질 약물 응집체를 고분자 용액내에 분산시켜 유화시켜 단백질 약물을 함유한 봉입체를 형성시키고, 상온 상압하에서 잔여 유기용매를 제거함에 따라 봉입체를 경화시켜 미립담체를 수득하는 단계를 포함하는 제조방법에 의하여 제조된다.

이하, 본 발명의 약물조절방출이 가능한 생분해성 고분자 미립담체를 제조하는 방법을 단계별로 나누어 구체적으로 설명하고자 한다.

제 1단계: 가역적 단백질 약물 응집체의 수득

폴리에스테르계 고분자 및 계면활성제를 포함하는 1차 유기용매내에 단백질 약물 수용액을 분산시킴으로써 가역적 단백질 약물 응집체를 수득한다: 이때, 1차 유기용매내로 단백질 약물 수용액이 분산됨에 따라 유기 용매가 물과 혼합되어 단백질의 용해도를 저하시킴으로, 가역적인 단백질 약물의 미세 응집체가 형성되어 미세입자로 침전된다. 전기 응집체의 확인은 분광광도계를 사용하여 600nm 파장에서 확인할 수 있으며, 입자의 크기에 있어서, 이후의 과정인 분산과 봉입에 적합한 미세입자인지를 광산란 입자크기 분석기를 사용하여 측정할 수 있다.

본 발명의 1차 유기용매내에 포함되는 계면활성제는 플루로닉 0.1% 내지 5%의 플루로닉 L121(Pluronic L121)을 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명에 있어서, 1차 유기용매는 수용액과의 혼합성과 고분자에 대한 용해성의 두가지 특성이 요구된다. 예를 들어, 수용액과의 혼합성을 지닌 유기용매로는 에틸아세테이트, 아세톤, 아세토나이트릴(acetonitrile), 다이메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide), 다이메틸아세트아마이드(dimethyl acetamide), 다이옥산(dioxane), 다이메틸포름아마이드(dimethyl formamide), 메탄올, 에탄올, 프로판올, 피리딘(pyridine), 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran), 부탄-2-올 또는 메틸에틸케톤(mehtyl ethyl ketone) 등이 있으며, 고분자에 대한 용해성을 지닌 유기용매로는 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 아세톤, 다이메틸설폭사이드, 다이메틸포름아마이드, N-메틸피롤리돈, 다이옥산, 테트라하이드로퓨란, 에틸아세테이트, 메틸에틸케톤 또는 아세토나이트릴 등이 있다. 아울러, 전기 두가지 특성을 모두 지니는 유기용매는 에틸아세테이트, 아세톤, 아세토나이트릴, 다이메틸설폭사이드, 다이메틸아세트아마이드, 테트라하이드로퓨란, 메틸에틸케톤, 다이옥산 등이다. 따라서, 1차 유기용매는 전기 두가지 특성을 모두 갖는 유기용매 또는 각각의 특성을 지닌 유기용매의 혼합용매가 사용할 수 있으며, 바람직하게는 각 특성을 지닌 유기용매의 혼합용매, 보다 바람직하게는 다이클로로메탄과 에틸아세테이트의 혼합용매가 사용된다.

생분해성 폴리에스테르계 고분자에 있어서, 바람직하게는 폴리-L-락트산(poly-L-lactic acid), 폴리-글리콜산, 폴리-D-락트산-co-글리콜산, 폴리-L-락트산-co-글리콜산, 폴리-D,L-락트산-co-글리콜산, 폴리-카프로락톤, 폴리-발레로락톤, 폴리-하이드록시 부티레이트 또는 폴리-하이드록시 발러레이트를 사용하며, 바람직하게는 폴리-D-락트산-co-글리콜산, 폴리-L-락트산-co-글리콜산, 또는 폴리-D,L-락트산-co-글리콜산(PLGA)이 사용되고, 보다 바람직하게는 락트산과 글리콜산의 비율이 1:1인 분자량 10,000내외의 폴리-D,L-락트산-co-글리콜산(PLGA)이 사용되며, 가장 바람직하게는 락트산과 글리콜산의 비율이 1:1인 분자량 10,000내외의 폴리-D,L-락트산-co-글리콜산(PLGA)이며 말단에 카르복실기를 가지는 것과 가지지 않는 것의 1:1 혼합물이 사용된다.

제 2단계: 고분자로 봉입된 가역적인 단백질 응집체를 포함하는 생분해성 고분자 미립담체의 제조

계면활성제를 포함하며 1차 유기용매와 동종인 2차 유기용매로 포화된 과량의 완충액을 첨가하여 전기 가역적 단백질 약물 응집체를 고분자 용액내에 분산시켜 유화시켜 단백질 약물을 함유한 봉입체를 형성시키고, 상온 상압하에서 잔여 유기용매를 제거함에 따라 봉입체를 경화시켜 미립담체를 수득한다: 이때, 2차 유기용매는 제 1단계의 1차 유기용매와 동일한 용매를 사용함이 바람직하며, 1차 유기용매의 혼합용매를 구성하는 각각의 용매를 사용할 수도 있다.

봉입체를 형성시키는데 있어서, 계면활성제를 포함하며 2차 유기용매로 포화된 완충액, 바람직하게는 시트르산염 완충액(citrate buffer)을 첨가하여, 균질기를 사용하여 약물 응집체를 고분자 용액내에 분산시켜 유화시킴으로써 단백질 약물 봉입체를 제조하게 된다. 계면활성제는 분자량 13,000 내지 23,000의 0.1 내지 5%의 폴리비닐알콜을 사용함이 바람직하고, 보다 바람직하게는 분자량 13,000 내지 23,000의 1%의 폴리비닐알콜을 사용한다.

전기 봉입체가 형성되면, 유기용매를 제거함에 따라 봉입체를 경화시켜 미립담체를 수득한다. 즉, 유화 단계에서 사용되는 에틸아세테이트는 통상의 유화과정에 쓰이는 용매인 다이클로로메탄에 비해 증발되는 속도가 충분히 느려서, 급격한 고분자의 경화가 일어나지 않는다. 따라서, 상온, 상압하에서 20시간 이내에 전기 봉입체 및 물의 혼합물을 교반하여 유기용매를 제거할 수 있으며, 바람직하게는 12시간 동안 교반하여 유기용매를 제거하여 봉입체를 경화시켜 미립담체를 수득하고, 미립담체는 원심분리하여 증류수로 세척하고 동결건조시켜 보관하며,

본 발명에 의하여 제조된 미립담체의 단백질 봉입량은, 바람직하게는 동결건조된 상태의 미립담체를 수산화나트륨용액에 첨가하여 37℃에서 2일동안 용해시킨 후, 용액의 단백질 농도를 UV로 측정하여 구할 수 있으며, 미립담체의 형상은 동결건조된 미립담체를 금으로 코팅시켜 주사전자현미경을 사용하여 관찰할 수 있으며, 미립담체의 봉입량 및 미립담체의 형상의 확인은 이에 한정되는 것은 아니다.

상술한 본 발명의 약물조절방출이 가능한 생분해성 미립담체의 제조방법을 도 1에 간략하게 나타내었는 바, 본 발명의 제조방법은 생분해성 폴리에스테르계 고분자 담체 내에 약물을 봉입함으로써 단백질의 가역적 응집현상을 이용하여 안정화된 응집체를 제조하는 특징을 가진다. 아울러, 응집체를 제조하는데 있어서, 단백질 약물의 비가역적인 변성된 응집체의 형성을 막음으로써, 단백질 약물의 가역적인 응집체가 수용액에 다시 용해됨에 따라, 약물이 미립담체내에서 지속적으로 방출되어 분비될 수 있다. 또한, 고분자 담체내의 약물의 봉입을 위하여 미세크기의 약물입자를 별도로 제조하는 단계없이 간단한 과정에 의하여 안정한 단백질 약물 응집체를 제조할 수 있으며, 미세입자로 형성시키기 전에 단백질 약물 응집체를 제조함으로써 유화과정의 계면에서 응집체가 비활성화되지 않게 된다. 이외에도, 종래기술에서 사용되는 Zn^{2+} 와 같은 양이온성 안정제의 사용없이 단백질의 자체 성질을 이용하여, 안정화된 단백질 약물 응집체를 제조하므로, 제조과정이 간단해지는 장점을 가진다.

본 발명의 방법에 의하여 제조된 미립담체의 크기는 1 내지 50 μm , 바람직하게는 1 내지 20 μm , 보다 바람직하게는 2 내지 5 μm 로 조절되며, 이러한 미세한 크기의 미립담체는 약물의 확산 경로가 짧아서 단백질 약물 응집체의 용해속도에 따라서만 약물이 방출되므로, 30일 내지 40일 동안 약물의 방출효과가 지속적으로 유지되는 특성을 가진다.

본 발명의 지속적 약물방출이 가능한 생분해성 미립담체는 장기간 투여가 요구되는 백신, 호르몬 제제 및 기타 치료약물에 응용될 수 있다. 예를 들어, 미립담체의 유효성분으로 사용되는 약물은 인간성장호르몬, G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor), GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), 에리스로포이에틴(erythropoietin), 백신, 항체, 인슐린, 칼시토닌(calcitonin), ACTH(adrenocorticotrophic hormone), 글루카곤, 소마토스태틴(somatostatin), 소마토트로핀(somatotropin), 소마토메딘(somatomedin), 부갑상선호르몬, 시상하부 분비물질, 갑상선호르몬, 프로락틴(prolactin), 엔돌핀, VEGF(vascular endothelial growth factor), 엔케팔린(enkephalin), 바소프레신(vasopressin), 신경성장촉진제(nerve growth factor), 비자연발생적 오피오이드(non-naturally occurring opioid), 수퍼옥사이드 디스무타제(superoxide dismutase), 인터페론, 아스파라기나제(asparaginase), 알기나제(arginase), 트립신, 키모트립신(chymotrypsin) 및 펩신으로 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있으며, 이에 한정되지 않고 장기 투여를 요구하는 모든 약물은 본 발명의 제조방법의 대상이 된다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 단백질 약물 응집체의 특성 분석

약물조절방출이 가능한 생분해성 미립담체의 유효성분인 약물 응집체의 형성에 있어서, 본 발명의 유기용매인 에틸아세테이트를 사용하였을 경우에 형성되는 약물 응집체와 종래에 사용되던 유기용매인 다이클로로메탄을 사용하였을 경우에 형성되는 약물 응집체를 하기와 같이 비교 수행하였다. 즉, 4.41 mg/ml 농도의 인간성장호르몬(동아제약, 대한민국)의 인산염 완충용액(phosphate buffer) 0, 0.2, 0.5, 0.7 또는 1ml를 에틸아세테이트 또는 다이클로로메탄이 포함된 증류수 5ml에 각각 첨가한 후, 3시간 동안 방치하여 단백질의 용해도가 유기용매에 의해 감소되어 응집체로 침전되게 하였다. 전기 형성된 단백질의 응집체는 분광광도계(spectrophotometer, Beckman DU-600, U.S.A)를 사용하여 600nm 파장에서의 광투과도(transmittance)로 확인하고, 전기 단백질의 응집체가 유기용매상의 분산과 봉입에 적합한 미세입자임을 광산란입자크기 분석기(dynamic light scattering instrument, Zeta-plus, U.S.A.)를 사용하여 응집체의 크기를 분석함으로써 확인하였으며, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[표 1]

인간성장호르몬 응집체의 형성 정도와 그 크기

	단백질의 최종농도(mg/ml)	응집체의 지름(μm)	광투과율(%)
에틸아세테이트로 포화된 증류수	0.00	검출되지 않음	100.0
	0.17	검출되지 않음	99.6
	0.40	2.27	72.4
	0.54	2.79	56.5
	0.74	2.29	46.8
다이클로로메탄으로 포화된 증류수	0.74	검출되지 않음	99.9

상기 표 1에서 보듯이, 증류수에 혼합되어 포화된 유기용매에 의하여 단백질이 지름 2 내지 3 μm 정도의 미세입자로 침전되며, 물과 혼합되지 않는 유기용매(다이클로로메탄)의 경우에는 미세입자로 침전되는 현상이 일어나지 않음을 확인하였다.

이어, 전기 생성된 응집체의 물/유기용매 계면에서의 불활성화 작용에 대한 저항성, 즉 응집체의 안정성과 그 이후에 가역적으로 용해되는 성질을 확인하기 위하여 하기의 과정을 수행하였다. 즉, 인간성장호르몬 2.5mg을 포함한 수용액 0.4 ml를 다이클로로메탄 또는 에틸아세테이트 13 ml에 첨가하고, 균질기(homogenizer)를 이용하여 1,000rpm에서 유화시킨 후, 각각 10초, 30초, 1분 또는 2분 동안 계면(shear)에 노출시켰다. 그 후, 생성된 단백질의 응집체가 가역적으로 용해되도록, 혼합액을 증류수 100ml에 첨가하여 12시간 동안 상온, 상압하에서 교반하여 유기용매를 증발시켜서 제거한 다음, 용해된 단백질의 양을 마이크로-BCA(micro-bicinchoninic acid) 방법으로 측정하였다.

도 2는 단백질 약물 응집체의 가역적인 성질을 나타낸 그래프이다: 이때, ●는 에틸아세테이트를 사용하여 제조한 단백질 약물 응집체의 가역적인 용해도를; ○는 다이클로로메탄을 사용하여 제조한 단백질 약물 응집체의 가역적인 용해도를 나타낸다. 도 2에서 보듯이, 물과의 혼합성이 없는 종래기술의 다이클로로메탄을 사용한 경우, 물/유기용매 계면에 노출되자마자(10초) 80% 이상이 변성된 비가역적 응집체가 되어 다시 용해되지 못하는데 반하여, 에틸아세테이트를 사용하여 제조한 본 발명의 단백질 약물 응집체의 경우 2분까지도 변성된 응집체의 양이 20% 이하에 불과함을 확인하였다.

따라서, 에틸아세테이트를 유기용매로 사용하여 단백질 응집체를 제조할 경우에만 미세입자 크기의 가역적 단백질 약물 응집체를 형성함을 확인할 수 있었다.

실시예 2: 인간성장호르몬을 함유한 미립담체(microparticle) 제형의 제조

인간성장호르몬을 인산염 완충액에 용해시킨 단백질 용액 0.51mL을 2.5mL의 다이클로로메탄 또는 다이클로로메탄과 에틸아세테이트의 동등 비율의 1차 유기용매에 첨가하였다. 이때, 1차 유기용매 상에는 1000mg의 PLGA와 계면활성제로서 2%(w/v)의 플루로닉 L121(Pluronic L121, BASF, U.S.A.)을 포함하고 있으며, PLGA(Boehringer Ingelheim, Germany)는 락트산과 글리콜산의 비율이 1:1의 분자량 10,000내외의 것으로, 그 말단에 카르복실 그룹을 지니고 있는 것과 없는 것을 1:1로 섞은 혼합물을 사용하였으며, 이 과정에서 단백질 약물 응집체를 형성하였다.

그 후, 형성된 약물 응집체를 고분자 용액속에 분산시키기 위하여 균질기(homogenizer, Tekmar Co., Model SDT 1810)를 사용하여, 이를 1.0%(w/v)의 폴리비닐알콜(분자량 13,000 ~ 23,000)을 계면활성제로 사용하는 5mM의 시트르산염 완충용액(citrate buffer) 230mL 상에서 유평시켰다. 2차 유기용매를 용해시키기 위하여 시트르산염 완충용액을 사용하여 다이클로로메탄 또는 다이클로로메탄과 에틸아세테이트로 포화시키고, 3분간 균질기(homogenizer, Fischer Scientific, PowerGen 700)를 사용하여 포화시켰다. 이어, 약 12시간 동안 상온, 상압하에서 교반하여 다이클로로메탄과 에틸아세테이트를 공기중으로 증발시켜서 제거한 다음, 경화된 미립당체를 원심분리하여 수거한 후, 증류수로 세척하고 동결건조시켰다. 하기 표 2에 상술한 각 제조방법을 정리하였다.

[표 2]

미립당체의 제조방법

제조방법	1차 유기용매	2차 유기용매	단백질의 용입량(%)	용입효율
대조군	다이클로로메탄		12.2	98.4
실시에 2-1	다이클로로메탄:에틸아세테이트=1:1	다이클로로메탄	8.5	70.8이상
실시에 2-2	다이클로로메탄:에틸아세테이트=1:1	다이클로로메탄 및 에틸아세테이트	14.4	약 100.0

상기 표 2에서 보듯이, 본 발명의 실시에 2-1 또는 실시에 2-2는 대조군인 종래기술의 제조방법 보다 단백질 응집체가 확산경로가 극히 짧은 미립당체의 제조방법이며, 실시에 2-1 보다는 실시에 2-2가 단백질의 용입량 및 용입효율 측면에서 훨씬 월등함을 확인할 수 있다.

전기 제조된 단백질의 용입량은 10mg의 동결건조된 미립당체를 3mL의 0.1N 수산화나트륨 수용액에 37℃에서 2일 동안 용해시킨 후, 용액의 단백질 농도를 UV로 측정하였으며, 미립당체의 형상은 동결건조된 미립당체를 금으로 코팅시킨 후, 주사전자현미경(Scanning Electron Microscopy, SEM, 필립스 535M)을 이용하여 관찰하였다.

도 3a는 종래기술의 제조방법에 따른 인간성장호르몬을 함유한 미립 당체의 주사현미경 사진이며, 도 3b는 본 발명의 실시에 2-1에 따른 인간 성장호르몬을 함유한 미립 당체의 주사현미경 사진이고, 도 3c는 본 발명의 실시에 2-2에 따른 인간성장호르몬을 함유한 미립 당체의 주사현미경 사진이다.

이어, 미립당체의 크기 분포를 입도분포측정기(particle counter system, PAMAS-2120)를 이용하여 측정한 결과, 종래기술인 다이클로로메탄을 사용한 제조법의 경우 100m 내외의 크기이나, 용매에 에틸아세테이트를 함께 사용한 본 발명의 실시에 2-1의 경우에는 그 크기가 50m 내외로 줄어드는 것을 알 수 있었다. 게다가, 실시에 2-2의 경우에는 10m 이하로 그 크기가 현격히 줄어들음을 알 수 있었는데, 본 발명의 제조방법 B에 의한 미립 당체가 가장 미세한 입자로 제조됨을 확인할 수 있었다.

실시에 3: 미립당체로부터 단백질 약물의 방출

전기 제조된 생분해성 고분자 미립당체로부터 인간성장호르몬이 지속적으로 제어방출되는지를 확인하기 위하여, 하기의 실험실내(in vitro) 조건으로 방출량을 측정하였다. 즉, 20mg의 동결건조된 미립당체들을 0.02%(w/v)의 트윈 20을 포함한 10mL의 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)로 충전된 폴리스티렌 용기에 분산시킨 후, 35일간 37℃에서 약물이 지속적으로 방출되도록 하였으며, 방출된 단백질 약물은 일정시간 간격마다 원심분리하여 미립구들을 침전시키고, 상등액을 취하여 그 약물의 농도를 마이크로-BCA 정량법을 이용하여 측정하였으며, 침전시킨 미립구는 새로운 완충용액(PBS)에 분산시켜서, 일정 pH를 유지하며 방출실험을 계속하였다.

도 4는 시간의 변화에 따른 인간성장호르몬을 함유한 미립 당체의 방출량을 나타낸 그래프이다: 이때, ●는 종래기술의 방법에 의한 미립 당체를; ▽는 본 발명의 실시에 2-1에 의한 미립 당체를; ■는 본 발명의 실시에 2-2에 의한 미립 당체를 각각 나타낸다. 도 4에서 보듯이, 종래기술의 제조방법에 의하여 제조된 미립 당체는 35 여일이 지나도 30% 미만의 약물방출량만을 나타내는 반면, 본 발명의 실시에 2-1의 미립 당체는 55% 이상이 방출되며, 놀랍게도 본 발명의 방법 B의 미립 당체의 약물의 방출량은 35일까지 총 약물의 80%가 지속적으로 방출되는 바, 본 발명의 실시에 2-2에 의하여 제조된 미립 당체가 약물의 지속적인 방출에 우수한 제형임일 확인할 수 있었다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 지속적으로 약물 조절방출이 가능한 생분해성 고분자 미립당체는 (1) 폴리에스테르계 고분자 및 계면활성제를 포함하는 1차 유기용매내에 단백질 약물 수용액을 분산시킴으로써 가역적 단백질 약물 응집체를 수득하는 단계; 및, (2) 계면활성제를 포함하여 1차 유기용매와 동종인 2차 유기용매로 포화된 과량의 완충액을 첨가하여 전기 가역적 단백질 약물 응집체를 고분자 용액내에 분산시켜 유평시켜 단백질 약물을 함유한 용입체를 형성시키고, 상온 상압하에서 잔여 유기용매를 제거함에 따라 용입체를 경화시켜 미립당체를 수득하는 단계를 포함하는 제조방법에 의하여 제조된다. 본 발명에 의하면, 단백질 약물의 비가역적인 변성된 응집체의 형성을 막음으로써, 단백질약물의 가역적인 응집체가 수용액에 다시 용해됨에 따라, 약물이 가역적 용해속도에 따라 미립당체내에서 지속적으로 방출되는 특징을 가진다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(1) 폴리에스테르계 고분자 및 계면활성제를 포함하는 1차 유기용매내에 단백질 약물 수용액을 분산시킴으로써 가역적 단백질 약물 응집체를 수득하는 단계; 및, (2) 계면활성제를 포함하며 2차 유기용매로 포화된 과량의 완충액을 첨가하여 전기 가역적 단백질 약물 응집체를 고분자 용액내에 분산시켜 유화시켜 단백질 약물을 함유한 봉입체를 형성시키고, 상온 상압하에서 잔여 유기용매를 제거함에 따라 봉입체를 경화시켜 미립당체를 수득하는 단계를 포함하는 약물조절방출이 가능한 생분해성 고분자 미립당체의 제조방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서,

1차 유기 용매는 하기의 (i) 및 (ii)의 혼합물 또는 (iii)으로부터

선택되며, 2차 유기용매는 1차 유기 용매와 동일한 용매 또는

1차 유기 용매의 혼합물을 구성하는 것을 용매인 것을 특징으로 하는

약물조절방출이 가능한 생분해성 고분자 미립당체의 제조방법:

(i) 에틸아세테이트, 아세톤, 아세토나이트릴,

다이메틸설폭사이드, 다이메틸포름아마이드, 다이메틸아세트아마이드,

다이옥산, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 피리딘, 테트라하이드로퓨란,

부탄-2-올 및 메틸에틸케톤으로 구성된 그룹으로부터 선택되며,

수용액과의 혼합성을 지닌 유기용매;

(ii) 메틸렌클로라이드, 클로르포름, 아세톤, 다이메틸설폭사이드,

다이메틸포름아마이드, N-메틸피롤리돈, 다이옥산, 테트라하이드로퓨란,

에틸아세테이트, 메틸에틸케톤 및 아세토나이트릴로 구성된

그룹으로부터 선택되며, 고분자에 대한 용해성을 지닌 유기용매;

(iii) 아세톤, 다이메틸설폭사이드, 다이메틸포름아마이드, 다이옥산,

테트라하이드로퓨란, 에틸아세테이트, 메틸에틸케톤 및

아세토나이트릴로 구성된 그룹으로부터 선택되며,

수용액과의 혼합성 및 고분자에 대한 용해성을

지닌 유기용매.

청구항 3.

제 1항에 있어서,

단백질 약물은 인간성장호르몬, G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor), GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor),

에리스로포이에틴(erythropoietin), 백신, 항체, 인슐린, 글루카곤,

칼시토닌(calcitonin), ACTH(adrenocorticotrophic hormone),

소마토스태틴(somatostatin), 소마트로핀(somatotropin),

소마토메딘(somatomedin), 부갑상선호르몬, 갑상선호르몬,

시상하부 분비물질, 프로락틴(prolactin), 엔돌핀,

VEGF(vascular endothelial growth factor), 엔케팔린(enkephalin),

바소프레신(vasopressin), 신경성장촉진인자(nerve growth factor),

비자연발생적 아편양제제(non-naturally occurring opioid),

인터페론, 아스파라기나제(asparaginase), 알기나제(arginase),

수퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase), 트립신,

키모트립신(chymotrypsin) 및 펩신으로 구성된 그룹으로부터 선택되는

것을 특징으로 하는

·약물조절방출이 가능한 생분해성 고분자 미립담체의 제조방법.

청구항 4.

제 1항에 있어서,

2차 유기용매는 하기의 (i) 및 (ii)의 혼합물 또는 (iii)으로부터

선택되는 것을 특징으로 하는

약물조절방출이 가능한 생분해성 고분자 미립담체의 제조방법:

(i) 에틸아세테이트, 아세톤, 아세토나이트릴,

다이메틸설폭사이드, 다이메틸포름아마이드, 다이메틸아세트아마이드,

다이옥산, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 피리딘, 테트라하이드로퓨란,

부탄-2-올 및 메틸에틸케톤으로 구성된 그룹으로부터 선택되며,

수용액과의 혼합성을 지닌 유기용매;

(ii) 메틸렌클로라이드, 클로르포름, 아세톤, 다이메틸설폭사이드,

다이메틸포름아마이드, N-메틸피롤리돈, 다이옥산, 테트라하이드로퓨란,

에틸아세테이트, 메틸에틸케톤 및 아세토나이트릴로 구성된

그룹으로부터 선택되며, 고분자에 대한 용해성을 지닌 유기용매;

(iii) 아세톤, 다이메틸설폭사이드, 다이메틸포름아마이드, 다이옥산,

테트라하이드로퓨란, 에틸아세테이트, 메틸에틸케톤 및

아세토나이트릴로 구성된 그룹으로부터 선택되며,

수용액과의 혼합성 및 고분자에 대한 용해성을 지닌 유기용매.

청구항 5.

제 1항에 있어서,

생분해성 폴리에스테르계 고분자는 폴리-L-락트산, 폴리-글리콜산,

폴리-D-락트산-co-글리콜산, 폴리-L-락트산-co-글리콜산,

폴리-D,L-락트산-co-글리콜산, 폴리-카프로락톤, 폴리-발레로락톤,

폴리-하이드록시 부티레이트 및 폴리-하이드록시 발러레이트로 구성된

그룹으로부터 선택된 고분자로서 분자량이 1,000 이상인 것을

특징으로 하는

약물조절방출이 가능한 생분해성 고분자 미립담체의 제조방법.

청구항 6.

제 1항에 있어서,

1차 유기용매내에 포함되는 계면활성제는 0.1 내지

5%의 플루로닉 L121(Pluronic L121)인 것을 특징으로 하는

약물조절방출이 가능한 생분해성 고분자 미립담체의 제조방법.

청구항 7.

제 1항에 있어서,

2차 유기용매로 포화된 완충액에 포함되는 계면활성제는

분자량이 13,000 내지 23,000의 0.1 내지 5%의

폴리비닐알콜을 사용하는 것을 특징으로 하는

약물조절방출이 가능한 생분해성 고분자 미립담체의 제조방법.

청구항 8.

제 1항의 방법에 의하여 제조되며, 다음과 같은 특징을 가지는 약물조절방출이 가능한 생분해성 고분자 미립담체:

(i) 1차 유기용매 및 2차 유기용매는 다이클로로메탄과 에틸아세테이트의 혼합 용매이며;

(ii) 생분해성 폴리에스테르계 고분자는 폴리-D-락트산-co-글리콜산, 폴리-L-락트산-co-글리콜산 및 폴리-D,L-글리콜산(PLGA)로 구성된 그룹으로부터 선택되며;

(iii) 미립담체의 크기가 1 내지 50 μ m이다.

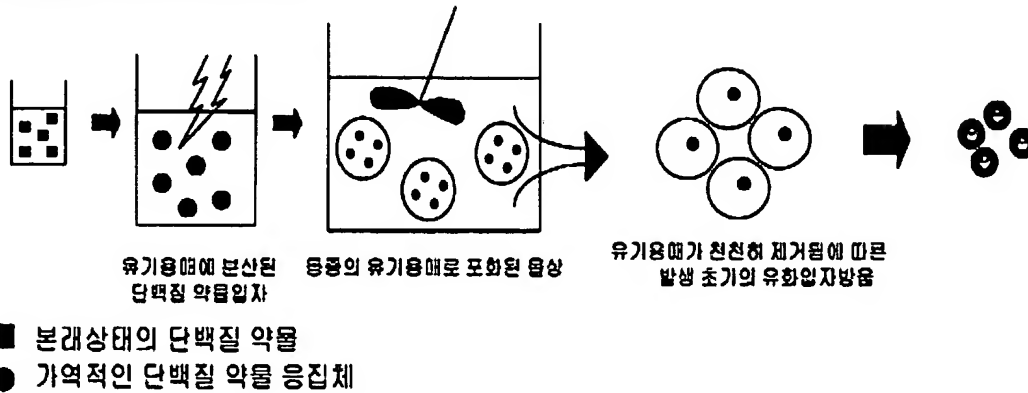
청구항 9.

단백질 약물은 인간성장호르몬이며, 1차 유기용매는 다이클로로메탄과 에틸아세테이트가 1:1로 혼합된 용매이고, 2차 유기용매는 다이클로로메탄과 에틸아세테이트가 1:5.4로 혼합된 용매이며, 생분해성 고분자는 락트산과 글리콜산의 비율이 1:1인 폴리-D,L-락트산-co-글리콜산을 사용하여 제 1항의 방법에 의하여 제조되는 크기가 1 내지 20 μ m인, 약물조절방출이 가능한 생분해성 고분자 미립담체.

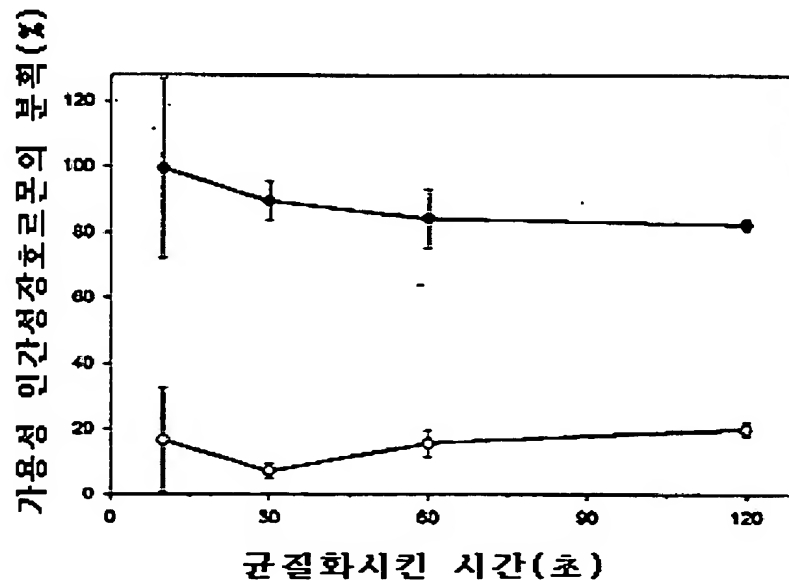
도면

도면 1

약물입자/유기용매/물



도면 2

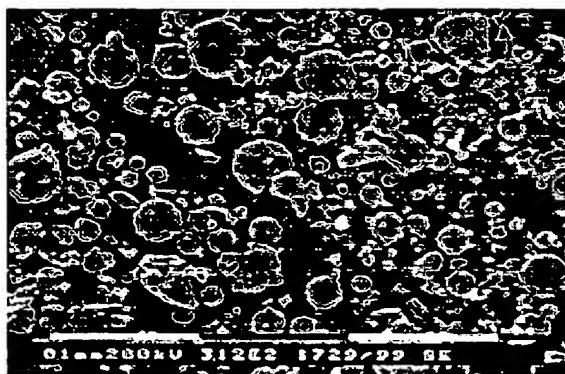


BEST AVAILABLE COPY

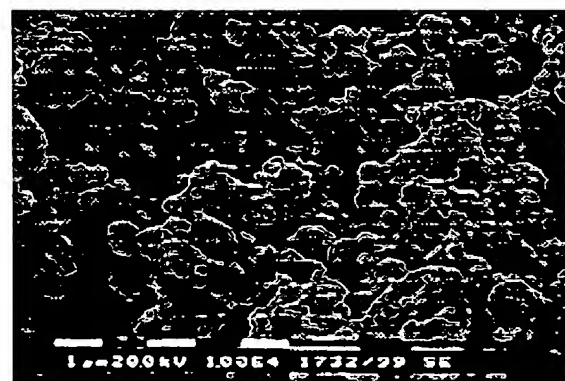
도면 3a



도면 3b



도면 3c



도면 4

